

RNA NÁDOROVÉ VAKCÍNY NA BÁZI DENDRITICKÝCH BUNĚK

RNA CANCER VACCINES BASED ON DENDRITIC CELLS

DUDOVÁ S.¹, MICHÁLEK J.^{1,2,3}, HÁJEK R.^{1,3,4}

¹ LABORATOŘ EXPERIMENTÁLNÍ HEMATOLOGIE A BUNĚČNÉ IMUNOTERAPIE PŘI ODDĚLENÍ KLINICKÉ HEMATOLOGIE, FAKULTNÍ NEMOCNICE BRNO

² I. DĚTSKÁ INTERNÍ KLINIKA, FAKULTNÍ NEMOCNICE BRNO

³ UNIVERZITNÍ ONKOLOGICKÉ CENTRUM MASARYKOVY UNIVERZITY V BRNĚ

⁴ INTERNÍ HEMATOONKOLOGICKÁ KLINIKA, FAKULTNÍ NEMOCNICE BRNO

Souhrn: V posledních letech se objevují nové přístupy pro stimulaci nádorově specifické imunity s využitím dendritických buněk naložených nádorovými antigeny. Dendritické buňky (DB) jsou výkonné antigen prezentující buňky, které mají schopnost aktivace CD4+ a CD8+ naivních T-lymfocytů a podílí se tak na vzniku primární imunitní odpovědi *in vitro* a *in vivo*. Bylo prokázáno, že DB transfekované ribonukleovou kyselinou (RNA) kódující tumor asociované antigeny nebo celkovou nádorovou RNA aktivují T-buněčné odpovědi u různých typů nádorové tkáně. Některé z metod se prokázaly být natolik účinné a bezpečné, že byly zahájeny klinické zkoušky I/II fáze. Tento článek porovnává různé formy antigenů, které mohou být vneseny do dendritických buněk. Dále se zaměří na metody transfekce RNA určené pro přípravu protinádorových vakcín a zmíní některé z dosavadních výsledků klinických studií.

Klíčová slova: dendritické buňky, antigen, RNA, elektroporace, transfekce

Summary: Over the last decade, new strategies for induction of tumor specific immunity using dendritic cells loaded with tumor antigens have emerged. Dendritic cells (DCs) are potent antigen-presenting cells that have the unique capability of activating CD4+ and CD8+ naive T lymphocytes and thus participate in the induction of primary immune response *in vitro* and *in vivo*. It was shown that DCs transfected with ribonucleic acid (RNA) coding for a tumour-associated antigen or whole tumour RNA are able to induce T-cell responses in various tumor tissues. Several approaches have proved to be successful and safe enough to lead to the initiation of clinical phase 1/2 trials. This review compares various forms of antigens that can be transferred into dendritic cells. Furthermore, it focuses on different methods of RNA transfection intended for the preparation of anticancer vaccines and notices some recent results of clinic studies.

Key words: dendritic cells, antigen, RNA, electroporation, transfection

1. Úvod

Pole nádorové imunoterapie se v posledních letech rozrostlo také o využití dendritických buněk (DB) naložených nádorovými antigeny (tumor associated antigens, TAA), což představuje vhodnou strategii pro vyvolání protektivní imunitní reakce. Dendritické buňky jsou jedinečné antigen prezentující buňky (APB) díky své schopnosti nabídnout pohlcené a zpracovaný antigen nejen paměťovým, ale i naivním T-lymfocytům, a zároveň jsou klíčovými modulátory imunitní odpovědi ovlivňující diferenciaci T-lymfocytů směrem k Th1 nebo Th2 odpovědi (1, 2). Metody pro přípravu protinádorových vakcín mohou být rozděleny do dvou kategorií: antigen-specifické, ve kterých nádorové antigeny byly identifikovány a izolovány a buněčné nebo-li antigen-nespecifické metody, u kterých antigeny nejsou dosud známy, ale předpokládá se jejich přítomnost v materiálu použitým pro přípravu vakcín.

2. Druhy antigenů a jejich zpracování

Antigeny mohou být do DB dodány ve formě peptidů, purifikovaných proteinů, extraktů z nádorových buněk, apoptických tělísek nebo nukleových kyselin (DNA nebo RNA) (tab. 1). Tento materiál je v konečné fázi dendritickou buňkou rozštěpen na krátké oligopeptidy, které jsou poté exprimovány na povrchu buňky ve spojení s molekulami hlavního histokompa-

tilního komplexu (HLA) a nabídnuty receptoru T-lymfocytů (TCR, T-cell receptor), což představuje první aktivační signál. DB tvoří s T-lymfocyty shluky za přispění různých adhezivních molekul, především CD54 (ICAM-1), CD102 (ICAM-3) a CD58 (LFA-3), které jsou exprimované ve vysoké míře na aktivovaných DB. Druhý signál důležitý pro spuštění imunitní odpovědi představuje interakce kostimulačních molekul na povrchu DB s odpovídajícími ligandy T-buněk. Zprostředkovan je povrchovými molekulami CD80 (B7-1), CD86 (B7-2) na povrchu DB a CD28 v membráně T-lymfocytů. Při nedostatečném druhém signálu je indukována anergie T lymfocytů. Úspěšná vakcína by měla indukovat jak antigen-specifické CD4+, tak CD8+ buňky. CD4+ T-lymfocyty jsou nutné pro vznik a udržení CD8+ T-buněčných odpovědí a mohou přímo nebo nepřímo přispět ke zničení nádorových buněk. Významnost CD8+ T-buněk v imunitní odpovědi spočívá v inhibici tumorového růstu a eradikaci nádorových buněk (3). Forma, v jaké je antigen doručen do DB ovlivňuje cestu prezentace antigenu a její účinnost, ale také následnou kvalitu aktivace T-buněk (4). Je známo, že zralé DB exprimují vyšší hladiny HLA a kostimulačních molekul, a proto jsou schopnými stimulatory T-lymfocytů *in vivo* (5). Naproti tomu nezralé DB exprimují nízké hladiny maturačních markerů, jejich stimulace T-buněk není účinná a tak spíše tolerují než imunizují (6). Obecně se

pro transfekci používají nezralé DB, které jsou až následně maturovány přidáním různých cytokinů. Byly ovšem popsány i postupy opačné, tj. transfekce již zralých DB (7, 8).

2.1. Peptidové a proteinové antigeny

Bylo potvrzeno, že peptidem nebo proteinem naložené DB jsou schopnými induktory antigen-specifické protinádorové odpovědi nejen na zvířecích modelech, ale i u onkologických pacientů (9, 10). Strategie založené na využití peptidů mají své nevýhody, jako jsou například přechodná prezentace antigenních epitopů T-buňkám kvůli rychlému odbourávání vytvořených peptid/HLA komplexů nebo variabilita vazebných afinit syntetických peptidů. Naložení DB peptidem vyžaduje aminokyselinnou sekvenci kompatibilní s individuálním HLA typem pacienta (nejčastěji zastoupený je typ HLA-A2). Při aplikaci některých HIV proteinů byl navíc zjištěn přímý efekt na imunitní funkce buněk (11). Naložení proteinů o plné délce jako antigeny umožňuje vznik imunitní odpovědi vůči jeho různým epitopům.

Klinické odpovědi na vakcíny s využitím proteinů a peptidů jsou minimální, a pokud se objeví, obvykle nekorelují s velikostí měřené T-buněčné odpovědi (12). Nižší odpovědnost odráží preferenční indukci T-buněk s nízkou aviditou, které potom nerozeznávají nižší hustotu epitopu na nádorových buňkách po zpracování endogenně expimovaného antigeny a současnou ztrátu vysoce afinitních T-lymfocytů (13). Účinnost peptidové strategie může být také snížena disociací peptidu z molekul HLA třídy I nebo rychlým odbouráváním a výměnou povrchových molekul HLA třídy I, což ústí ve zkrácenou dobu prezentace antigeny (14).

2.2. Nádorové buňky a extrakty

Jako antigeny mohou být využity i nádorové buňky ve formě lyzátu, apoptických tělísek či fúzní hybridom nádorové a dendritické buňky. Takto připravené vakcíny však obsahují i jiné molekuly, které nejsou antigenní a mohou negativně ovlivnit imunitní odpověď. Další překážkou může být zisk požadovaného množství nádorových buněk (15, 16, 17, 18, 19).

2.3. Genetický materiál

Použití genetického materiálu (DNA nebo RNA) umožňuje produkci celých proteinů, které po zpracování mohou poskytnout množství různých epitopů obou HLA tříd, I i II. Genetický materiál je dostupnější než proteiny, může být upraven přidáním dalších sekvencí, které zlepšují translaci a expresi proteinu (polyadenylace), sekvencí, které směřují protein k požadované HLA molekule (signál pro vazbu k endolysozomu

Tabulka č. 1. Výhody a nevýhody antigenů vnášených do DB

Forma antigeny	Výhody	Nevýhody
Peptid/protein	specifita komerční výroba příprava vakcíny proti jednomu konkrétnímu antigeny bezpečnost	nutnost znát HLA typ pacienta rychlé odbourávání peptid/HLA komplexů omezené množství identifikovaných peptidů a proteinů izolace a čistota proteinů závislá na množství nádorové tkáně krátká životnost
Lyzáty nádorových buněk, apoptická tělíška	celkový imunogenní materiál nádorové buňky	obsahují i neantigenní molekuly, které mohou ovlivnit imunitní odpověď
DNA	snadná příprava stabilita možnost přidání signálních sekvencí amplifikace materiálu	riziko nežádoucího začlenění DNA do genomu buňky vznik senzitivní imunitních buněk vůči vlastní DNA nízká účinnost transfekce a exprese transgenu
RNA	bezpečnost vnese více molekul RNA najednou možnost přidání signálních sekvencí přímá translace do proteinu v cytoplasmě amplifikace materiálu	citlivost menší stabilita krátká životnost tranzientní transfekce

Tabulka č. 2. Srovnání metod transfekce RNA

Metody transfekce RNA	Výhody	Nevýhody
Virové vektory	vysoká účinnost přenosu vysoká exprese transgenu	riziko rekombinace požadavky na vybavení laboratoře imunodominance riziko exprese virových proteinů spolu s vnášenými antigeny
Kationické lipidy	nenáročnost	toxická omezené množství vnášené RNA nízká účinnost
Pasivní transfekce	nenáročnost	nízká účinnost
Elektroporace	vysoká exprese transgenu	mortalita buněk

LAMP-1, invariantní řetězec Ii) nebo zvyšují imunogenicitu kódovaných epitopů (20, 21, 22).

2.3.1. Deoxyribonukleová kyselina (DNA)

Použití deoxyribonukleové kyseliny (DNA) má také svoje nevýhody – nižší účinnost transfekce primárních buněk a možný vznik stabilních transfektantů (23). Nevirové DNA transfekční metody nejsou účinné, obzvláště u nedělicích se buněk, protože do jádra, kde dochází k transkripci, je transportováno pouze

omezené množství DNA (24). Při studiu transfekce HeLa buněk bylo pozorováno, že 95% buněk obsahuje vnášený plazmid v cytoplasmě, ale pouze jejich část (30%) exprimuje kódovaný protein (25).

2.3.2. Ribonukleová kyselina (RNA)

Bylo zjištěno, že neviróv přenos RNA je ve srovnání s DNA účinnější (26). Po elektroporaci dendritických buněk mRNA kódující eGFP (enhanced green fluorescent protein) byla nejvyšší exprese naměřena druhý den po transfekci a bylo dosaženo 76ti-násobného zvýšení

fluorescence, kdy 95% buněk bylo transfekováno. Vysoká exprese byla zachována nejméně po pět následujících dní. Naopak při použití plazmidové eGFP DNA bylo získáno pouze 15% transfekovaných buněk a 28mi-násobný nárůst fluorescence (4).

Celková buněčná RNA nebo mRNA představují soubor všech genů aktuálně exprimovaných v buňce. Dendritické buňky transfekované jak celkovou RNA, tak mRNA, která představuje pouze 1-5% buněčné RNA, byly schopny vyvolat tumor-specifickou odpověď *in vitro* bez rozdílů v cytotoxické aktivitě T-lymfocytů (27). Transfekcí RNA lze na rozdíl od použití DNA obejít problémy s regulací transkripce a RNA tak má po vstupu do buňky přímý přístup k translaci. Výhodou při použití RNA je transfekce do cytoplazmy, zatímco DNA vyžaduje přístup přímo do jádra buňky (4). Pro klinické aplikace je použití RNA bezpečnější z důvodu její omezené schopnosti způsobovat permanentní genetické změny v hostiteli (28).

Jako další výhoda RNA metod se uvádí, že do buňky může být vneseno více různých molekul mRNA najednou. Takováto polyvalentní vakcína snižuje pravděpodobnost úniku nádoru imunitnímu systému a indukuje CTL odpovědi namířené proti přirozeně zpracovaným a prezentovaným imunodominantním nádorovým antigenům (27). Vnesení mRNA může být maturačním signálem pro DB, vedoucí k zvýšené expresi aktivačních markerů CD83 a CD86, což je spojeno s vyšší schopností stimulace T buněk a získkem migračních vlastností (29). Při transfekci gag mRNA z viru HIV zůstává po transfekci většina proteinu produkovaná nezralými DB uvnitř buňky, na rozdíl od jiných linií. Intracelulárně vytvořený protein je rozštěpen proteazomovým systémem na peptidy a naložen na molekuly HLA třídy I v endoplazmatické retikulu. Část gag proteinu je secernována a následně pohlcena dendritickou buňkou pomocí endocytózy, což představuje způsob naložení na HLA molekulu třídy II. Naložení antigenu na HLA molekul třídy I i II bylo po transfekci potvrzeno aktivací a expanzí antigen-specifických CD4+ a CD8+ T-buněk (30).

K produkci většího množství mRNA je vhodná metoda amplifikace pomocí PCR přes komplementární DNA (cDNA) a následná transkripce *in vitro* (31). Pro amplifikaci byla použita mRNA izolovaná z nádorových linií, stejně jako z primárních nádorových buněk získaných mikrodisekcí (32). Nativní RNA byla účinnější při stimulaci CTL odpovědi než amplifikovaná mRNA (27). Při manipulaci s RNA existují i nevýhody, jako je například její krátká životnost a stabilita či větší citlivost. Dendritické buňky naložené RNA

Tabulka č. 3. Sledované typy antigenů transfekovaných do DB

	Typy antigenu	Použitá nádorová tkáň
Antigen specifická RNA	katalytická jednotka telomerázy (hTERT)	melanom, thymom (4, 36)
	ovalbumin (OVA)	melanom (51, 66)
	karcinembryonální antigen (CEA)	adenokarcinom (21, 57, 63, 64)
	VEGFR-2, Tie, VEGF	melanom, žlučník (63)
	prostatický antigen (PSA)	prostata (28, 40)
	survivin	AML (39)
	MAGE-3	Mnohočetný myelom, melanom (20)
	Melan-A	Melanom (35)
Celková RNA		B-CLL (65)
		nádor prsu (62)
		myelom (62)
		CNS (54)
		urotelální karcinom (55)
		karcinom žaludku (52)
		renální karcinom (27, 40)

kódující velké množství antigenů jsou využívány ke stimulaci T-buněčných protinádorových odpovědí *in vitro*. CTL odpovědi byly indukovány z mononukleárních buněk periferní krve zdravých dárců a pacientů s nádory proti reportérovému proteinu eGFP, různým antigenům virového původu, jako například influenza virus matrix protein, HPV E6 a E7, gag proteinu HIV viru (21, 33, 34, 35), stejně jako normálním omezeně exprimovaným genovým produktům, které mohou sloužit jako nádorové antigeny – prostatický antigen (PSA), telomerázová reverzní transkriptáza (TERT), survivin, onkofetální antigen (OFA), karcinembryonální antigen (CEA), Melan-A (36, 37, 38, 39).

3. Metody transfekce RNA do dendritických buněk

Pro RNA transfekci se vedle virových vektorů používají většinou fyzikální metody. I když tyto neviróvé metody ústí v tranzientní genovou expresi, bylo zjištěno, že i nízké hladiny exprese antigenu jsou dostatečné pro stimulaci T-buněčné odpovědi (32, 40) (Tab. 2).

3.1. Virové vektory

Antigeny mohou být do DB vneseny

pomocí rekombinantních virů, jako jsou například retroviróvé nebo adenovirové vektory, vakcína, influenza viry či pox-viry (41, 42, 43, 44). Použití virových vektorů s sebou ovšem nese riziko v tom, že mohou ovlivňovat funkci DB (45). I když je touto metodou dosahováno vysoké exprese transgenů, překážku představuje především riziko integrace virové DNA do hostitelské buňky a také buněčná imunita namířená proti virovým proteinům, která může vést až k destrukci geneticky modifikovaných DB a závažným toxickým vedlejším účinkům (11, 46, 47, 48).

3.2. Kationické lipidy

Jednou z možností naložení dendritických buněk RNA jsou kationické lipidy, jako je například lipofekční činidlo *N*-(1-(2,3-diioleoyloxypropyl)-*N,N,N*,-trimethylammonium methylsulfate (DOTAP). Nevýhodou jsou ale jeho toxické účinky na dendritické buňky a omezené množství RNA, které je schopen na sebe navázat. Reagencie na lipidové bázi vedou k nízké účinnosti RNA transfekce do DB, přičemž účinnost transfekce je ovlivněna typem použitého lipidu nebo poměrem nukleové kyseliny k lipidům. (49, 34, 50, 37). Boczkowski a kol. transfekovali myši DB kultivované z kostní dře-

ně mRNA pro kuřecí ovalbumin (OVA). Tyto buňky byly poté schopny stimulovat OVA-specifické cytotoxické T-lymfocyty *in vitro*. CTL odpovědi mohou být indukovány celkovou RNA, RNA transkribovanou *in vitro* z OVA cDNA templátu nebo poly-A+, nikoli však poly-A- frakcí izolovanou z OVA-exprimujících buněk. Myši po vakcinaci dendritickými buňkami modifikovanými RNA z OVA-exprimujících EL-4 nádorových buněk byly chráněny vůči těmto nádorovým buňkám. Při použití slabě imunogenní melanomové nádorové linie B16/F10.9 bylo u myši vakcinovaných DC-RNA pozorováno snížené metastázování v plicích (51).

Koido a kolektiv sledovali imunitní odpověď po vakcinaci DB transfekovanými MUC1 RNA. Byla prokázána exprese MUC1 peptidů a kostimulačních molekul na buněčném povrchu. Po injekci do báze ocašku byly transfekované DB detekovány v tříselných lymfatických uzlinách. Vakcinace kontrolních myši těmito DB vedla k anti-MUC1 imunitní odpovědi vůči MUC1-pozitivním MC38/MUC1, ale ne MUC1-negativním nádorovým buňkám. Žádná nebo velmi malá anti-MUC1 imunita byla indukována s transfekovanými DB v MUC1 transgenních myších. Tato rezistence byla zvrácena při podání transfekovaných DB spolu s IL-12 (52).

Imunitní odpověď může být indukována i pro virové antigeny. DB naložené M1 RNA (kódující influenza virus matrix protein) jsou schopné stimulovat M1-specifické naivní a paměťové cytotoxické T-lymfocyty. DB transfekované M1 RNA stimulují produkci INF- γ ve vysokých koncentracích, podobně jako po naložení peptidem. Naproti tomu, DB modifikované DNA stimulují pouze malé množství CTL produkujících INF- γ . DB ošetřené neantigenním materiálem – GFP RNA/lipozomy, GFP DNA/lipozomy, samotnými lipozomy, nebo DB či CTL samotnými neprokázaly aktivaci odpovědných buněk (34).

Zájem vědců se zaměřuje také na identifikaci dalších nádorových antigenů. Jeden z nich, survivin, patří do rodiny inhibitorů apoptózy. Survivin specifické CTL lyzovaly řadu hematopoetických maligních buněčných linií a primární nádorové buňky izolované z pacientů s akutní myeloidní leukémií. Vakcinace myši se survivin exprimujícími DB měla za následek dlouhodobou rezistenci po vystavení lymfomovým buňkám (39). Podobně jako katalytická podjednotka telomerázy má použití survivinu jako antigenu pro vakcinační účely tu výhodu, že snížení exprese nebo ztráta antigenu jako mechanismus imunitního úniku zabraňuje další progresi nádoru (36, 39).

3.3. Pasivní transfekce

Jako další způsob vnášení antigenů do nezralých DB byla využita samotná mRNA v mediu, tzv. pasivní transfekce, která je dostatečná k vyvolání specifické CTL odpovědi. Pasivní transfekce byla použita úspěšně nejenom v preklinických, ale i klinických studiích (28, 33, 34, 36).

DB koinkubované s RNA izolovanou z renální nádorové tkáně jsou schopny indukovat nádorově-specifickou T-lymfocytární odpověď *in vitro*. CTL lyzují allogení nádorové buňky, ale ne allogení buňky normálních tkání. Tímto způsobem se podařilo připravit imunitní odpověď nejen vůči primárním, ale i metastatickým tumorům (53). Na základě tohoto přístupu byly provedeny klinické zkoušky I fáze, do které bylo zařazeno 10 pacientů s renálními tumory. Vakcína byla nejen bezpečná, ale také schopna stimulovat expanzi tumor specifických polyklonálních T-buněk u imunizovaných pacientů (29).

Imunoterapeutické přístupy se používají i v léčbě mozkových tumorů, i když je zde riziko vzniku experimentální alergické encefalitidy (EAE) při použití nádorového materiálu z CNS jako zdroje antigenů. Australská skupina v čele s D. A. Carusem provedla klinické zkoušky I. fáze podáním DB naložených nádorovou RNA dětským pacientům s mozkovými nádory. U žádného z pacientů nebyly pozorovány symptomy EAE nebo jiné autoimunitní odpovědi. U tří ze sedmi pacientů, kteří dostávali vakcínu se objevila klinická odpověď na vakcina-

ci: u jednoho částečná imunitní odpověď a u dvou stabilní onemocnění. Vakcinace nevyvolala robustní tumor-specifickou imunitní odpověď, ale zvýšila buněčnou odpověď na další nespecifické stimuly (54).

Dalším typem nádorové tkáně, pro kterou byl využit postup přípravy nádorově specifických CTL je uroteliální karcinom. Tumor infiltrující lymfocyty (TIL) nezabíjejí autologní nádorové buňky *in vitro*, ovšem po jednorázové aktivaci autologními DB naloženými nádorovou mRNA byly TIL schopny indukovat lýzu autologních karcinomových buněk. Tento efekt nebyl pozorován po inkubaci TIL s netransfekovanými DB (55).

Dendritické buňky pasivně transfekované mRNA kódující prostatický antigen (PSA) stimulují CTL odpovědi, které nevykazují zkříženou reakci na kallikrein, protein, který je homologní s PSA. Protože u zdravých žen nedochází k významné PSA expresi, zatímco zdraví muži nebo pacienti s tumorem prostaty jsou vystaveni vyšším hladinám cirkulujícího PSA proteinu, byl u těchto skupin předpokládán rozdíl ve schopnosti indukce CTL vůči PSA. Bylo ovšem potvrzeno, že PSA RNA transfekované DB ze zdravých dárců, mužů i žen, nebo nádorových pacientů jsou stejně účinné ve stimulaci PSA-specifických CTL (40).

Polyvalentní nádorové vakcíny, které používají celé antigenní spektrum nádorové buňky představují výhodnější terapeutickou strategii pacientů s nádory než vakcíny namířené proti jednotlivým antigenům. I když polyklonální CTL odpovědi vzniklé s použitím RNA amplifikované z mikrodisekovaných nádorových buněk prostaty zahrnují jako komponentu odpověď vůči prostatickým antigenům (PSA), stejně jako vůči telomerázové reverzní transkriptáze (hTERT), tumor specifické CTL byly efektivnější než samotné PSA nebo hTERT CTL v rozeznávání a lýze cílových buněk. Navíc CTL lyzují nejenom buňky primárního nádoru, ale i metastázy (31, 53).

Někteří autoři ovšem popisují pasivní transfekce jako neúčinnou metodu (23, 34, 51). Koinkubace DB v roztoku s RNA vedla v těchto případech k nízké expresi antigenu. M1 mRNA naložené a nenaložené DB nejevily významný rozdíl v cytotoxicitě jimi aktivovaných CTL. Vyšší exprese mRNA v CD34+-DB byla pozorována pouze při pasivní transfekci neantigenní eGFP mRNA. Rozdíl může být způsoben použitím jiných prekurzorů dendritických buněk a následnou kultivací či odlišností ve vnášené RNA. Možným důvodem dosažené nízké účinnosti touto metodou je, že zahrnuje prodlouženou inkubaci labilní RNA s buněčnou kulturou, přičemž RNA vstupující do buněk endocytózou může být úspěšně degradována, speciálně u nezralých dendritických buněk, které jsou zaměřené na příjem a degradaci okolního materiálu (4).

3.4. Elektroporace RNA

Elektroporace představuje fyzikální metodu vnášení transgenů, která využívá pulzů o vysokém napětí k otevření pórů v membráně buňky, což umožňuje průchod molekulám DNA nebo RNA. Elektroporace nevyžaduje další reagentie a může být použita i pro klinické studie. Optimalizace a stanovení úspěšnosti elektroporace je většinou prováděno pomocí analýzy exprese transgenů eGFP (enhanced green fluorescent protein) (56). Měření povrchových markerů typických pro zralé DB jako jsou CD83, CD80 a CD86 nebyl zjištěn vliv elektroporace na maturaci DB ani na stimulaci T-lymfocytů (23, 57). Elektroporace představuje účinnější postup vnášení antigenní RNA do DB než pasivní transfekce či lipofekce (49). Nevýhodou elektroporační metody je mortalita buněk způsobená špatným uzavřením pórů po aplikaci elektrického pulzu. Při použití definovaných antigenů bylo zjištěno, že DB elektroporované mRNA jsou efektivnější ve schopnosti indukovat antigen-specifickou CTL odpověď *in vitro* než DB naložené peptidy nebo dokonce DB po transdukcii rekombinantními virovými vektory (21, 43, 51). Německá skupina z Tübinge-

nu v čele s Grunebachem porovnávala procenta úspěšnosti transfekce s využitím mRNA pro eGFP protein u následujících způsobů naložení DB: elektroporace, lipofekce a na CD71-receptor vázané dodání Ag. Elektroporace se prokázala jako nejvíce účinná s 30% eGFP pozitivních buněk, zatímco systém využívající transferinový receptor poskytoval méně než 1% eGFP exprimujících buněk. Dodáním RNA pomocí lipozomů bylo získáno 17,5% eGFP pozitivních buněk v závislosti na množství RNA. Když tyto přístupy byly použity pro transfekci DB s RNA izolovanou z eGFP exprimující linie renálního karcinomu N43 a následnou přípravu tumor-specifických CTL, všechny způsoby transfekce byly schopné navodit cytotoxickou odpověď, i když bylo použito malé množství RNA (27). Jiná skupina potvrdila srovnatelnost exprese transgenů po elektroporaci s transdukci retrovirovými (RV) nebo adenovirovými (AdV) vektory (26).

Nicméně bylo prokázáno, že antigen-specifické T-buňky mohou vznikat po stimulaci RNA transfekovanými DB i když nebyla detekována exprese transgenů na proteinové úrovni (32, 40). Nižší koncentrace peptidů na povrchu DB po RNA transfekci ve srovnání s koncentracemi dosaženými po exogenním naložení peptidy nesnižuje účinnost indukce CTL a může upřednostňovat vznik vysoce afinitních cytotoxických lymfocytů a tak ústít ve vysoce specifickou nádorovou cytotoxicitu. Při srovnání mRNA a plazmidové DNA vnášené do DB pomocí elektroporace byla mRNA účinněji transfekována a s nižší buněčnou toxicitou než DNA (37). Elektroporaci lze dosáhnout vysoké účinnosti s vysokými hladinami exprese vnášeného genu až po dobu 14 dní (58). DB byly transfekovány eGFP mRNA nebo celkovou buněčnou RNA izolovanou z eGFP exprimující linie K562. I když intenzita eGFP exprese v DB transfekovaných celkovou RNA byla nižší ve srovnání s expresí v DB transfekovaných s IVT eGFP mRNA, určitá cytoplazmatická syntéza eGFP byla potvrzena v DB transfekovaných celkovou RNA (59).

Tuyaerts a spolupracovníci porovnávali transgenní expresi mRNA v DB po elektroporaci a mRNA spontánně pohlcenou DB. Výsledky prokázaly vyšší expresi mRNA u elektroporovaných dendritických buněk, což se projevilo i jejich vyšší schopností vyvolat antigen-specifickou T-buněčnou odpověď vůči antigenu (35). DB elektroporované s mRNA kódující Melan-A silně aktivovaly Melan-A-specifické cytotoxické T-lymfocytární klonu a byly účinnější než DB naložené mRNA lipofekcí nebo volně smíchané s RNA (37).

U většiny myších a lidských nádorů je telomerázový ribonukleový komplex (TERT) reaktivován, zatímco v normálních tkáních je neaktivní. DB naložené myši TERT RNA aktivují CTL, které rozeznávají myši melanomové a thymomové buňky. Ve shodě s předcházejícími pozorováními bylo zjištěno, že DB transfekované celkovou RNA připravenou z TERT-pozitivního nádoru poskytují větší protinádorovou ochranu než DB naložené pouze TERT RNA. TERT pravděpodobně není imunodominantní antigen u myši (53). Naopak u lidí byla mRNA telomerázové kataly-

tické podjednotky hTERT po elektroporaci do DB schopna vyvolat stimulaci cytotoxických T-lymfocytů (4).

Metoda elektroporace DB celkovou nádorovou RNA se ukázala jako vhodná ke stimulaci odpovědi i vůči méně imunitním malignitám, jako je například rakovina prsu. CTL odpovědi stimulované celkovou RNA mohou mít selektivní specifitu pro část prezentovaných peptidů, ale nerozeznávají všechny epitopy exprimované na nádorové buňce (60). Podobně bylo dosaženo CTL odpovědi i u myelomu s použitím linií LP-1 a U266. Milazzo a kolektiv připravili CTL schopné lyze těchto linií antigen-specifickým a HLA I. třídy omezeným způsobem. LP-1 specifické CTL neprokazovaly specifitu na idiotypový protein izolovaný z této linie. U myelom-asociovaného antigenu, mucinu 1 (MUC1) byla potvrzena specifická reakce CTL indukovaných DB transfekovanými RNA z U266 myelomové linie (61).

V poslední době se zájem zaměřuje i na kombinaci nádorové imunoterapie a antiangiogenní terapie. Pro inhibici angiogeneze byly myši imunizovány DB, které byly elektroporovány mRNA kódující produkty exprimované během neoangiogeneze: receptor-2 pro vaskulární endotelový růstový faktor (VEGFR-2) a Tie2, exprimované v proliferujících endotelových buňkách, a vaskulární endotelový růstový faktor (VEGF) exprimovaný v angiogenním stromatu a nádorových buňkách. Vakcinace myši stimulovala CTL odpovědi a vedla k částečné inhibici angiogeneze spolu s inhibicí růstu tumorů u nádorových modelů B16/F10.9 melanomových metastáz a MBT-2 nádoru žlučníku. Imunizace nádorovou RNA (B16/F10.9 nebo MBT-2) stimuluje tumor specifickou protektivní imunitu a takto ovlivňuje nádorové buňky přímo, zatímco použití VEGFR-2 nebo Tie2 ovlivňuje vaskularizační proces. Současné podání DB naložených VEGFR-2 nebo Tie2 a celkové nádorové RNA vykazovala synergistický protinádorový efekt, který byl pozorován i po společné imunizaci různými kombinacemi definovaných tumor exprimovaných antigenů, TERT nebo TRP-2, a VEGF nebo VEGFR-2 (62). Některé z výsledků preklinických a klinických studií jsou shrnuty v tabulce 3.

4. Závěr

Kromě alogenního přístupu nenašla doposud buněčná imunoterapie pevné místo v klinické praxi. Jde však o dynamicky se rozvíjející perspektivní výzkumný směr, který dnes nabízí širokou škálu experimentálních klinických aplikací včetně využití RNA vakcín. RNA vakcíny jsou bezpečné a schopné vyvolat CD4+ i CD8+ imunitní odpověď. Bude však nutná další optimalizace metod vnášení antigenního materiálu do dendritických buněk. Jedním ze způsobů zlepšení imunitní odpovědi je modifikace RNA sekvence ke zlepšení její stability a účinnosti translace a také sekvencí, které ovlivňují zpracování peptidu a tak zvyšují antigenicitu. V neposlední řadě rozvoj moderních metod detekce imunitních odpovědí na tyto vakcíny usnadní a urychlí další rozvoj.

Literatura

1. Banchereau J., Steinman R. M. Dendritic cells and the control of immunity. *Nature*. 1998, 392(6673):245-52
2. Reid S. D., Penna G., Adorini L. The control of T cell responses by dendritic cell subsets. *Current Opinion in Immunology* 2000, 12(1): 114-121
3. Melief C. J., Kast W. M. T-cell immunotherapy of tumors by adoptive transfer of cytotoxic T lymphocytes and by vaccination with minimal essential epitopes. *Immunol Rev*. 1995, 145: 167-77
4. Saeboe-Larsen S., Fossberg E., Gaudernack G. mRNA-based electrotransfection of human dendritic cells and induction of cytotoxic T lymphocyte responses against the telomerase catalytic subunit (hTERT). *J Immunol Methods*. 2002, 259(1-2):191-203
5. Dhodapkar M. V., Steinman R. M., Sapp M. et al. Rapid generation of broad T-cell immunity in humans after a single injection of mature dendritic cells. *J Clin Invest*. 1999, 104(2): 173-80
6. Dhodapkar M. V., Steinman R. M., Krasovsky J. et al. Antigen-specific inhibition of effector T cell function in humans after injection of immature dendritic cells. *J Exp Med*. 2001, 193(2): 233-8
7. Liao X., Li Y., Bonini C. et al. Transfection of RNA encoding tumor antigens following maturation of dendritic cells leads to prolonged presentation of antigen and the generation of high-affinity tumor-reactive cytotoxic T lymphocytes. *Mol Ther*. 2004, 9(5): 757-64
8. Schaft N., Dorrie J., Thumann P. et al. Generation of an optimized polyvalent monocyte-derived dendritic cell vaccine by transfecting defined RNAs after rather than before maturation. *J Immunol*. 2005, 174(5): 3087-97

9. Nestle F. O., Alijagic S., Gilliet M. et al. Vaccination of melanoma patients with peptide- or tumor lysate-pulsed dendritic cells. *Nat Med.* 1998, 4(3): 328-32
10. Thurner B., Haendle I., Roder C. et al. Vaccination with mage-3A1 peptide-pulsed mature, monocyte-derived dendritic cells expands specific cytotoxic T cells and induces regression of some metastases in advanced stage IV melanoma. *J Exp Med.* 1999, 190(11): 1669-78
11. Chirmule N., Pahwa S. Envelope glycoproteins of human immunodeficiency virus type 1: profound influences on immune functions. *Microbiol Rev.* 1996, 60(2):386-406
12. Rosenberg S. A. Progress in human tumour immunology and immunotherapy. *Nature.* 2001, 411(6835): 380-4
13. Yee C., Savage P. A., Lee P. P. et al. Isolation of high avidity melanoma-reactive CTL from heterogeneous populations using peptide-MHC tetramers. *J Immunol.* 1999, 162(4): 2227-34
14. Wang R. F., Wang H. Y. Enhancement of antitumor immunity by prolonging antigen presentation on dendritic cells. *Nat Biotechnol.* 2002, 20(2): 149-54
15. Albert M. L., Sauter B., Bhardwaj N. Dendritic cells acquire antigen from apoptotic cells and induce class I-restricted CTLs. *Nature.* 1998, 392(6671): 86-9
16. Asavaroengchai W., Kotera Y., Mule J. J. Tumor lysate-pulsed dendritic cells can elicit an effective antitumor immune response during early lymphoid recovery. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 2002, 99(2): 931-6
17. Pospisilova D., Borovickova J., Rozkova D. et al. Methods of dendritic cell preparation for acute lymphoblastic leukemia immunotherapy in children. *Med Oncol.* 2005, 22(1): 79-88
18. Marten A., Renoth S., Schmidt-Wolf I. G. Increase of the stimulatory effect of dendritic cells by pulsing with apoptotic bodies transfected with the MHC class II gene. *Mol Immunol.* 2002, 39(7-8): 395-8
19. Zhang J. K., Li J., Zhang J. et al. Antitumor immunopreventive and immunotherapeutic effect in mice induced by hybrid vaccine of dendritic cells and hepatocarcinoma in vivo. *World J Gastroenterol.* 2003, 9(3): 479-84
20. Bonehill A., Heirman C., Tuyaerts S. et al. Messenger RNA-electroporated dendritic cells presenting Mage-A3 simultaneously in HLA class I and class II molecules. *J Immunol.* 2004, 172(11): 6649-57
21. Nair S. K., Boczkowski D., Morse M. et al. Induction of primary carcinoembryonic antigen (CEA)-specific cytotoxic T lymphocytes in vitro using human dendritic cells transfected with RNA. *Nat Biotechnol.* 1998, 16(4):364-9
22. Wu T. C., Guarnieri F. G., Staveley-O'Carroll K. F. et al. M. Engineering an intracellular pathway for major histocompatibility complex class II presentation of antigens. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 1995, 92(25): 11671-5
23. Zarei S., Arrighi J. F., Ongaro G. et al. Efficient induction of CD8 T-associated immune protection by vaccination with mRNA transfected dendritic cells. *J Invest Dermatol.* 2003, 121(4):745-50
24. Luo D., Saltzman W. M. Synthetic DNA delivery systems. *Nat Biotechnol.* 2000, 18(1): 33-7
25. Tseng W. C., Haselton F. R., Giorgio T. D. Transfection by cationic liposomes using simultaneous single cell measurements of plasmid delivery and transgene expression. *J Biol Chem.* 1997, 272(41):25641-7
26. Lundqvist A., Noffz G., Pavlenko M. et al. Nonviral and viral gene transfer into different subsets of human dendritic cells yield comparable efficiency of transfection. *J Immunother.* 2002, 25(6):445-54
27. Grunebach F., Muller M. R., Nencioni A., Brossart P. Delivery of tumor-derived RNA for the induction of cytotoxic T-lymphocytes. *Gene Ther.* 2003, 10(5):367-74
28. Heiser A., Coleman D., Dannull J. et al. Autologous dendritic cells transfected with prostate-specific antigen RNA stimulate CTL responses against metastatic prostate tumors. *J Clin Invest.* 2002, 109(3):409-17
29. Su Z., Dannull J., Heiser A. et al. Immunological and clinical responses in metastatic renal cancer patients vaccinated with tumor RNA-transfected dendritic cells. *Cancer Res.* 2003, 63(9): 2127-33
30. Weissman D., Ni H., Scales D. et al. HIV gag mRNA transfection of dendritic cells (DC) delivers encoded antigen to MHC class I and II molecules, causes DC maturation, and induces a potent human in vitro primary immune response. *J Immunol.* 2000, 165(8): 4710-7
31. Heiser A., Maurice M. A., Yancey D. R. et al. Induction of polyclonal prostate cancer-specific CTL using dendritic cells transfected with amplified tumor RNA. *J Immunol.* 2001, 166(5):2953-60
32. Boczkowski D., Nair S. K., Nam J. H. et al. Induction of tumor immunity and cytotoxic T lymphocyte responses using dendritic cells transfected with messenger RNA amplified from tumor cells. *Cancer Res.* 2000, 60(4):1028-34
33. Thornburg C., Boczkowski D., Gilboa E., Nair S. K. Induction of cytotoxic T lymphocytes with dendritic cells transfected with human papillomavirus E6 and E7 RNA: implications for cervical cancer immunotherapy. *J Immunother.* 2000, 23(4): 412-8
34. Strobel I., Berchtold S., Gotze A. et al. Human dendritic cells transfected with either RNA or DNA encoding influenza matrix protein M1 differ in their ability to stimulate cytotoxic T lymphocytes. *Gene Ther.* 2000, 7(23):2028-35
35. Tuyaerts S., Michiels A., Corthals J. et al. Induction of Influenza Matrix Protein 1 and MelanA-specific T lymphocytes in vitro using mRNA-electroporated dendritic cells. *Cancer Gene Ther.* 2003, 10(9):696-706
36. Nair S. K., Heiser A., Boczkowski D. et al. Induction of cytotoxic T cell responses and tumor immunity against unrelated tumors using telomerase reverse transcriptase RNA transfected dendritic cells. *Nat Med.* 2000, 6(9):1011-7
37. Van Tendeloo V. F., Ponsaerts P., Lardon F. et al. Highly efficient gene delivery by mRNA electroporation in human hematopoietic cells: superiority to lipofection and passive pulsing of mRNA and to electroporation of plasmid cDNA for tumor antigen loading of dendritic cells. *Blood.* 2001, 98(1):49-56
38. Siegel S., Wagner A., Kabelitz D. et al. Induction of cytotoxic T-cell responses against the oncofetal antigen-immature laminin receptor for the treatment of hematologic malignancies. *Blood.* 2003, 102(13):4416-23
39. Zeis M., Siegel S., Wagner A. et al. Generation of cytotoxic responses in mice and human individuals against hematological malignancies using survivin-RNA-transfected dendritic cells. *J Immunol.* 2003, 170(11):5391-7
40. Heiser A., Dahm P., Yancey D. R. et al. Human dendritic cells transfected with RNA encoding prostate-specific antigen stimulate prostate-specific CTL responses in vitro. *J Immunol.* 2000, 164(10):508-14
41. Brossart P., Goldrath A. W., Butz E. A. et al. Virus-mediated delivery of antigenic epitopes into dendritic cells as a means to induce CTL. *J Immunol.* 1997, 158(7):3270-6
42. Kaplan J. M., Yu Q., Piraino S. T. et al. Induction of antitumor immunity with dendritic cells transfected with adenovirus vector-encoding endogenous tumor-associated antigens. *J Immunol.* 1999, 163(2):699-707
43. Kim C. J., Prevet T., Cormier J. et al. Dendritic cells infected with poxviruses encoding MART-1/Melan A sensitive T lymphocytes in vitro. *J Immunother.* 1997, 20(4):276-86
44. Butterfield L. H., Jilani S. M., Chakraborty N. G. et al. Generation of melanoma-specific cytotoxic T lymphocytes by dendritic cells transfected with a MART-1 adenovirus. *J Immunol.* 1998, 161(10):5607-13
45. Korst R. J., Mahtabifard A., Yamada R., Crystal R. G. Effect of adenovirus gene transfer vectors on the immunologic functions of mouse dendritic cells. *Mol Ther.* 2002, 5(3): 307-15
46. Jenne L., Hauser C., Arrighi J. F. et al. Poxvirus as a vector to transduce human dendritic cells for immunotherapy: abortive infection but reduced APC function. *Gene Ther.* 2000, 7(18): 1575-83
47. Jonuleit H., Tuting T., Steitz J. et al. Efficient transduction of mature CD83+ dendritic cells using recombinant adenovirus suppressed T cell stimulatory capacity. *Gene Ther.* 2000, 7(3): 249-54
48. Woods N. B., Muessig A., Schmidt M. et al. Lentiviral vector transduction of NOD/SCID repopulating cells results in multiple vector integrations per transduced cell: risk of insertional mutagenesis. *Blood.* 2003, 101(4): 1284-9
49. Kalady M. F., Onaitis M. W., Padilla K. M. et al. Enhanced dendritic cell antigen presentation in RNA-based immunotherapy. *J Surg Res.* 2002, 105(1):17-24
50. Turanek J., Toman M., Novak J. et al. Adjuvant effect of liposomes and adamantylamide dipeptide on antigenicity of entrapped synthetic peptide derived from HIV-1 transmembrane region glycoprotein gp41. *Immunol Lett.* 1994, 39(2): 157-61
51. Boczkowski D., Nair S. K., Snyder D., Gilboa E. Dendritic cells pulsed with RNA are potent antigen-presenting cells in vitro and in vivo. *J. Exp. Med.* 1996, 184: 465-472
52. Koido S., Kashiwaba M., Chen D. et al. Induction of antitumor immunity by vaccination of dendritic cells transfected with MUC1 RNA. *J Immunol.* 2000, 165(10): 5713-9
53. Heiser A., Maurice M. A., Yancey D. R. et al. Human dendritic cells transfected with renal tumor RNA stimulate polyclonal T-cell responses against antigens expressed by primary and metastatic tumors. *Cancer Res.* 2001, 61(8):3388-93
54. Caruso D. A., Orme L. M., Neale A. M. et al. Results of a phase I study utilizing monocyte-derived dendritic cells pulsed with tumor RNA in children and young adults with brain cancer. *Neuro-oncol.* 2004, 6(3): 236-46
55. Schmitt W. E., Stassar M. J., Schmitt W. et al. In vitro induction of a bladder cancer-specific T-cell response by mRNA-transfected dendritic cells. *J Cancer Res Clin Oncol.* 2001, 127(3): 203-6
56. Ponsaerts P., Van den Bosch G., Cools N. et al. Messenger RNA electroporation of human monocytes, followed by rapid in vitro differentiation, leads to highly stimulatory antigen-loaded mature dendritic cells. *J Immunol.* 2002, 169(4):1669-75
57. Eppler E., Horig H., Kaufman H. L. et al. Carcinoembryonic antigen (CEA) presentation and specific T cell priming by human dendritic cells transfected with CEA-mRNA. *Eur J Cancer.* 2002, 38(1):184-93
58. Ueno H., Tcherepanova L., Reygobellet O. et al. Dendritic cell subsets generated from CD34+ hematopoietic progenitors can be transfected with mRNA and induce antigen-specific cytotoxic T cell responses. *J. Immunol. Methods.* 2004, 285(2):171-80
59. Takahashi M., Narita M., Ayres F. et al. Cytoplasmic expression of EGFP in dendritic cells transfected with in vitro transcribed mRNA or cellular total RNA extracted from EGFP-expressing leukemia cells. *Med Oncol.* 2003, 20(4): 335-48
60. Muller M. R., Grunebach F., Nencioni A., Brossart P. Transfection of dendritic cells with RNA induces CD4- and CD8-mediated T cell immunity against breast carcinomas and reveals the immunodominance of presented T cell epitopes. *J Immunol.* 2003, 170(12): 5892-6
61. Milazzo C., Reichardt V. L., Muller M. R. et al. Induction of myeloma-specific cytotoxic T cells using dendritic cells transfected with tumor-derived RNA. *Blood.* 2003, 101(3):977-82
62. Nair S. K., Boczkowski D., Moeller B. et al. Synergy between tumor immunotherapy and antiangiogenic therapy. *Blood.* 2003, 102(3): 964-71
63. Morse M. A., Nair S. K., Boczkowski D. et al. The feasibility and safety of immunotherapy with dendritic cells loaded with CEA mRNA following neoadjuvant chemoradiotherapy and resection of pancreatic cancer. *Int J Gastrointest Cancer.* 2002, 32(1):1-6
64. Kalady M. F., Onaitis M. W., Emani S. et al. Dendritic cells pulsed with pancreatic cancer total tumor RNA generate specific antipancreatic cancer T cells. *J Gastrointest Surg.* 2004, 8(2):175-81
65. Muller M. R., Tsakou G., Grunebach F. et al. Induction of chronic lymphocytic leukemia (CLL)-specific CD4- and CD8-mediated T-cell responses using RNA-transfected dendritic cells. *Blood.* 2004, 103(5): 1763-9
66. Van Meirvenne S., Straetman L., Heirman C. et al. Efficient genetic modification of murine dendritic cells by electroporation with mRNA. *Cancer Gene Ther.* 2002, 9(9): 787-97